



(19) **RU** <sup>(11)</sup> **2 228 953** <sup>(13)</sup> **C2**  
 (51) Int. Cl.<sup>7</sup> **C 12 N 1/20, C 02 F 3/34, B**  
**09 C 1/10/(C 12 N 1/20, C 12 R**  
**1:38)**

RUSSIAN AGENCY  
 FOR PATENTS AND TRADEMARKS

(12) **ABSTRACT OF INVENTION**

(21), (22) Application: 2002122613/13, 23.08.2002

(24) Effective date for property rights: 23.08.2002

(46) Date of publication: 20.05.2004

(98) Mail address:  
 142253, Moskovskaja obl., Serpukhovskij r-n,  
 p/o Dashkovka, ul. Lenina, 102A, NITs TBP

(72) Inventor: Marchenko A.I. (RU),  
 Vorob'ev A.V. (RU), Djadishchev N.R.  
 (RU), Rybelkin S.P. (RU), Blokhin V.A.  
 (RU), Marchenko S.A. (RU)

(73) Proprietor:  
 Nauchno-issledovatel'skij tsentr  
 toksikologii i gigienicheskoy reglamentatsii  
 biopreparatov (RU),

(54) STRAIN OF BACTERIUM PSEUDOMONAS ALCALIGENES MEV USED FOR TREATMENT OF SOIL,  
 GROUND AND SURFACE WATER FROM PETROLEUM AND PRODUCTS OF ITS PROCESSING

(57) Abstract:

FIELD: industrial microbiology, ecology.  
 SUBSTANCE: strain of bacterium Pseudomonas  
 alcaligenes MEV is isolated from wheat  
 rhizosphere and deposited in All-Russian  
 collection of industrial microorganisms,  
 Moscow, at number B-8278. The strain  
 utilizes petroleum, mazut, diesel fuel,  
 polycyclic aromatic hydrocarbons comprising  
 from 2 to 4 benzene rings: naphthalene,  
 phenanthrene, anthracene, fluoranthene,  
 phenol. The strain is resistant to heavy

metal ions: Pb, Zn, Mo, Fe, Cr. The culture  
 Pseudomonas alcaligenes MEV produces  
 biological surface-active substances  
 (biosurfactants). The strain can be used for  
 preparing preparation for treatment of  
 soils, ground and surface waters from  
 petroleum, products of its processing and  
 also in the combined pollution with  
 petroleum hydrocarbons and metals. EFFECT:  
 valuable properties of microorganism. 10  
 tbl, 11 ex

RU 2 228 953 C2

RU 2 228 953 C2

(19) **RU** <sup>(11)</sup> **2 228 953** <sup>(13)</sup> **C2**(51) МПК<sup>7</sup> **C 12 N 1/20, C 02 F 3/34, B 09  
C 1/10/(C 12 N 1/20, C 12 R 1:38)**РОССИЙСКОЕ АГЕНТСТВО  
ПО ПАТЕНТАМ И ТОВАРНЫМ ЗНАКАМ

## (12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ПАТЕНТУ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ

(21), (22) Заявка: 2002122613/13, 23.08.2002  
(24) Дата начала действия патента: 23.08.2002  
(46) Дата публикации: 20.05.2004(56) Ссылки: RU 2134723 C1, 20.08.1999. RU  
2133770 C1, 27.07.1999. EP 1132462 A,  
12.09.2001. US 5656169 A, 12.08.1997. WO  
0056668 A1, 28.09.2000.(98) Адрес для переписки:  
142253, Московская обл., Серпуховский р-н,  
п/о Дашковка, ул. Ленина, 102А, НИЦ ТБП(72) Изобретатель: Марченко А.И. (RU),  
Воробьев А.В. (RU), Дядищев Н.Р.  
(RU), Рыбалкин С.П. (RU), Блохин В.А.  
(RU), Марченко С.А. (RU)(73) Патентообладатель:  
Научно-исследовательский центр токсикологии  
и гигиенической регламентации биопрепаратов  
(RU)(54) ШТАММ БАКТЕРИЙ PSEUDOMONAS ALCALIGENES MEV, ИСПОЛЬЗУЕМЫЙ ДЛЯ ОЧИСТКИ ПОЧВ,  
ГРУНТОВЫХ И ПОВЕРХНОСТНЫХ ВОД ОТ НЕФТИ И ПРОДУКТОВ ЕЕ ПЕРЕРАБОТКИ(57) Штамм бактерий Pseudomonas alcaligenes  
MEV выделен из ризосферы пшеницы,  
депонирован во Всероссийской коллекции  
промышленных микроорганизмов, г.Москва  
под номером В-8278. Штамм утилизирует  
нефть, мазут, дизельное топливо;  
полициклические ароматические  
углеводороды (ПАУ), содержащие от 2 до 4  
бензольных колец: нафталин, фенантрен,  
антрацен, флуорантен; фенол. Он устойчив кионам тяжелых металлов: Pb, Zn, Mo, Fe, Cr.  
Культура Pseudomonas alcaligenes MEV  
продуцирует биологические  
поверхностно-активные вещества  
(биосурфактанты). Штамм может быть  
использован для получения препарата для  
очистки почв, грунтовых и поверхностных вод  
от нефти, продуктов ее переработки, а также  
при комбинированном загрязнении  
углеводородами нефти и металлами. 10 табл.

RU 2 228 953 C2

RU 2 228 953 C2

Изобретение относится к области микробиологии и представляет собой новый бактериальный штамм, который может быть использован для очистки почвы, грунтовых и поверхностных вод от нефти и продуктов ее переработки.

Загрязнение окружающей среды нефтью и продуктами ее переработки представляет серьезную угрозу здоровью населения и природе. Тяжелые фракции нефти, токсичные и наиболее трудно разлагаемые, содержат полициклические ароматические углеводороды (ПАУ). ПАУ относятся к категории приоритетных загрязнителей окружающей среды.

Известны штаммы микроорганизмов: *Pseudomonas alcaligenes* E7 [1], *Trichoderma lignorum* Л-1 ГКМ ВИСР N 103 [2], *Pseudomonas alcaligenes* B-1 [3], *Mycobacterium flavescens* EX-91 [4], *Rhodococcus species* 56D [5], *Pseudomonas putida* 9 [6], *Rhodococcus species* MFN [7], которые могут разлагать углеводороды нефти, в том числе и ПАУ в почве и воде. Недостатком вышеперечисленных штаммов является то, что они осуществляют деградацию полициклических ароматических углеводородов, содержащих только 2 и 3 бензольных кольца.

Наиболее близким к предлагаемому изобретению является штамм бактерий *Pseudomonas alcaligenes* E7 [1], обладающий высокими характеристиками по биодegradации нефти и нефтепродуктов. Однако недостатком этого штамма является то, что из полициклических ароматических углеводородов он утилизирует только нафталин при температуре 20-30°C.

Цель изобретения состоит в получении нового штамма микроорганизмов, быстро и эффективно утилизирующего *in situ* в почвах, грунтовых и поверхностных водах нефть и продукты ее переработки при комбинированном загрязнении солями тяжелых металлов, а также продуцирующего внеклеточные биологические поверхностно-активные вещества (биосурфактанты), которые ускоряют биодegradацию малорастворимых гидрофобных ПАУ.

Предлагаемый штамм *Pseudomonas alcaligenes* MEV выделен из ризосферы пшеницы и селекционирован путем пересевов отдельных колоний бактерий на чашках с минимальным агаром А [8], который содержит (г/дм<sup>2</sup>: Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> × H<sub>2</sub>O - 6,0; KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> - 3,0; NaCl - 0,5; NH<sub>4</sub>Cl - 1,0; MgSO<sub>4</sub> × 7H<sub>2</sub>O - 0,3; CaCl<sub>2</sub> × 2H<sub>2</sub>O - 0,01; агар-агар - 15,0; вода дистиллированная - до 1 дм<sup>3</sup>; pH - 7,2; в присутствии фенантрена в количестве 300 мг на 1 дм<sup>3</sup> питательной среды.

Штамм *Pseudomonas alcaligenes* MEV идентифицирован в соответствии с определителем Берга [9] и депонирован во Всероссийской коллекции промышленных микроорганизмов (ВКПМ) под номером ВКПМ В-8278.

Предлагаемый штамм характеризуется следующими морфологическими и физиолого-биохимическими признаками. Грамотрицательные подвижные палочки размером 2-3 × 0,6-0,8 мкм, спор не образует. На агаризованной питательной среде из кислотного гидролизата рыбной муки на вторые сутки образуются плоские матовые

колонии диаметром 2-3 мм. В бульоне из кислотного гидролизата рыбной муки растет в виде пленки и равномерного помутнения.

Штамм является аэробом, обладает оксидазной и каталазной активностью, растет в температурном диапазоне от 8 до 41°C, оптимум 28°C. В качестве источника углерода потребляет ацетат, цитрат, сукцинат, аланин, аргинин. Обладает аргининдиоксидазной активностью, восстанавливает нитраты, денитрификационная активность отсутствует. Прототроф, в дополнительных факторах роста не нуждается. Гидролизует желатин, обладает лецитиназной и уреазной активностью. Не гидролизует крахмал и поли-β-оксидирует.

Штамм непатогенен (невирулентен, нетоксичен, токсигенностью не обладает). На штамм оформлено заключение о безопасности.

Генетические особенности. Культура устойчива к пенициллину 50 мг/см<sup>3</sup>, канамицину - 50 мг/см<sup>3</sup>. Штамм устойчив к ионам тяжелых металлов: Pb, Zn, Mo, Fe - 120 мг/дм<sup>3</sup>, Cr - 600 мг/дм<sup>3</sup>.

Культура использует в качестве единственного источника углерода нефть, нефтепродукты, полициклические ароматические углеводороды, содержащие 2, 3 и 4 бензольных кольца (нафталин, фенантрен, антрацен, флуорантен), а также фенол (таблица 3).

Штамм продуцирует биологические поверхностно-активные вещества (биосурфактанты). Штамм хорошо растет на богатых питательных средах на основе мясоептонного бульона (МПБ) и ферментативного гидролизата рыбной муки (ФГРМ).

Условия хранения: в лиофилизированном состоянии при 4°C - 3 года; на агаризованном ферментативном гидролизате рыбной муки при 4°C две недели, в пробирках на скошенном агаре под стерильным вазелиновым маслом при 4°C - до года. Штамм может поддерживаться регулярными пересевами (1 раз в 2 недели) на агаризованном ферментативном гидролизате рыбной муки с 300 мг/дм<sup>3</sup> фенантрена.

Изобретение поясняется следующими примерами.

Пример 1. Штамм бактерий *Pseudomonas alcaligenes* MEV выращивают аэробно в жидкой среде на ферментативном гидролизате рыбной муки с 200 мг/л фенантрена на качалке при 200 об/мин и температуре 26±2°C в течение 18 часов. Титр выросшей культуры составляет 2,0 × 10<sup>9</sup> колонии образующих единиц (КОЕ) на 1 см питательной среды.

Пример 2. Штамм *Pseudomonas alcaligenes* MEV выращивают на синтетической среде следующего состава, г/дм<sup>3</sup>: (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> - 0,5; KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> - 0,7; NaCl - 0,5; MgSO<sub>4</sub> × 7H<sub>2</sub>O - 0,8; дистиллированная вода - до 1 дм<sup>3</sup>; pH 7,2. Нефть, мазут, дизельное топливо добавляют в питательную среду в количестве 1% от массы питательной среды в качестве единственного источника углерода. Опыт проводят в четырех повторностях. В колбы объемом 100 см<sup>3</sup> вносят по 30 см<sup>3</sup> минеральной среды и по 300 мг нефти, мазута и дизельного

топлива. Колбы засевают клетками штамма *Pseudomonas alcaligenes* MEV до концентрации  $1.10^7$  КОЕ/см<sup>3</sup>. В качестве контролей используют незасеянные колбы со средой, а также с нефтью и нефтепродуктами. Колбы культивируют на качалке при 200 об/мин и 30°C течение 14 суток. Эффективность биодegradации определяют на газо-жидкостном хроматографе. Результаты эксперимента представлены в таблице 1. Полученные результаты показывают, что в течение 5 суток при 30°C штамм MEV утилизирует нефть, мазут и дизельное на %: 72,0, 53,4, 94,3 соответственно.

Таблица 1  
Биодegradация нефти в присутствии штамма MEV при температуре 30°C, сутки

Разбавление образцов MEV в течение 1 сутки, % (МЭВ)

Вещество	Биодegradация
Нефть	72,0-6,9
Мазут М-40	53,4-6,4
Дизельное топливо	94,3-7,1

Примечание: М - среднее четырех повторностей; м - доверительный интервал с вероятностью 95%.

Пример 3. Предлагаемый штамм культивируют также как в примере 2. Однако культивирование проводят при 20 °C. Результаты представлены в таблице 2.

Таблица 2  
Биодegradация нефти в присутствии штамма MEV при температуре 20°C, сутки

Разбавление образцов MEV в течение 3 суток, % (МЭВ)

Вещество	Биодegradация
Нефть	42,4-3,2
Мазут М-40	41,4-3,2
Дизельное топливо	62,1-6,3

Примечание: М - среднее четырех повторностей; м - доверительный интервал с вероятностью 95%.

Пример 4. В колбы на 100 см<sup>3</sup> вносят по 30 см<sup>3</sup> минеральной среды (состав среды указан в примере 2) и по 200 мг нафталина, фенантрена, антрацена, флуорантена, фенола. Колбы засевают культурой *Pseudomonas alcaligenes* MEV до концентрации  $1.10^7$  КОЕ/см<sup>3</sup>. В качестве контролей используют незасеянные колбы со средой, а также с изучаемыми веществами. Культивирование проводят на качалке при 200 об/мин, температуре 20°C в течение 5 суток. Эффективность биодegradации определяют на газо-жидкостном хроматографе. Результаты экспериментов показывают, что за 5 дней биодegradация нафталина и фенантрена прошла на 100%, а антрацена, флуорантена и фенола на %: 42,4; 62,1 и 46,3 соответственно (таблица 3).

Таблица 3  
Биодegradация биогенных соединений углеводородов в фазе культуры MEV при 20°C в течение 5 суток, % (МЭВ)

Вещество	Число клеток/мл в культуре	Биодegradация
Нафталин	2	82,4-3,2
Фенантрен	3	74,3-3,4
Антрацен	3	42,4-3,2
Флуорантен	4	62,1-3,3
Фенол	7	46,3-4,3

Примечание: М - среднее четырех повторностей; м - доверительный интервал с вероятностью 95%.

Пример 5. В колбы на 100 см<sup>3</sup> вносят по 30 см<sup>3</sup> синтетической среды (состав среды указан в примере 2), 300 мг нефти, 15 мг/дм<sup>3</sup> солей Pb, Zn, Mo, Fe и Cr 50 мг/дм<sup>3</sup> и клетки штамма *Pseudomonas alcaligenes* MEV до концентрации

$1.10^7$  КОЕ/см<sup>3</sup>. Контролем служит засеянная колба с нефтью. Исследуемые колбы культивируют в четырех повторностях на качалке при 28°C и 200 об/мин в течение 5 дней. Результаты эксперимента показывают, что эффективность биодegradации нефти предлагаемым штаммом в вариантах с солями металлов и без них не отличается (таблица 4).

Таблица 4  
Биодegradация нефти в присутствии штамма MEV, % (МЭВ)

Вещество	Биодegradация
Нефть	72,0-6,9

Примечание: М - среднее четырех повторностей; м - доверительный интервал с вероятностью 95%.

Пример 6. Культуральную жидкость штамма *Pseudomonas alcaligenes* MEV, выращенного как в примере 1, отделяют от микробных клеток центрифугированием при 5000 об/мин в течение 10 минут. В качестве биосурфактанта содержащей жидкости в опыте используется культуральная жидкость разведенная дистиллированной водой в 10 раз. Поверхностное натяжение этой жидкости определяют с использованием кольцевого тензиометра. Контролем служит дистиллированная вода. Результаты определения поверхностного натяжения показывают (таблица 5), что добавление культуральной среды в дистиллированную воду приводит к снижению поверхностного натяжения дистиллированной воды с 68,8 дин/см до 31,2 дин/см. Добавление питательной среды в таком же соотношении 1:10 не оказывает влияния на поверхностное натяжение дистиллированной воды. Таким образом, культуральная жидкость предлагаемого штамма содержит биологические поверхностно-активные вещества.

Таблица 5  
Влияние биосурфактанта содержащей культуральной жидкости штамма MEV на поверхностное натяжение дистиллированной воды, дин/см (МЭВ)

Исследуемая жидкость	Поверхностное натяжение
Дистиллированная вода	68,8-3,1
Биосурфактант содержащая жидкость	31,2-3,2
Дистиллированная вода + питательная среда	68,8-3,1

Примечание: М - среднее четырех повторностей; м - доверительный интервал с вероятностью 95%.

Пример 7. В колбы на 100 см<sup>3</sup> вносят по 27 см<sup>3</sup> синтетической среды и смесь, содержащую по 200 мг нафталина, фенантрена, антрацена, флуорантена. В колбы добавляют по 3 см<sup>3</sup> биосурфактанта содержащей культуральной среды как в примере 6. Колбы засевают культурой *Pseudomonas alcaligenes* MEV до концентрации  $1.10^7$  КОЕ/см<sup>3</sup>. В качестве контролей используют колбы со смесью нафталина, фенантрена, антрацена и флуорантена. Культивирование проводят на качалке при 200 об/мин, температуре 20°C в течение 5 суток. Эффективность биодegradации полициклических ароматических углеводородов определяют на газо-жидкостном хроматографе. Результаты экспериментов показывают (таблица 6), что добавление биосурфактанта повышает эффективность биодegradации ПАУ. Так, за 5 суток в вариантах опыта с добавлением биосурфактанта биодegradация нафталина и фенантрена прошла на 100%, а антрацена и флуорантена на %: 71%; 83% соответственно.

RU 2 222 8953 C2

RU 2 222 8953 C2

Таблица 6  
Биодegradация полициклических ароматических углеводородов штаммом  
Pseudomonas alcaligenes MEV при добавлении биосурфактанта, % (MCM)

Вещества	Число экспериментов в повторности	Биосурфактант добавлен	Без биосурфактанта
Нафталин	3	100	82,4±3,8
Фенантрен	3	100	78,3±3,8
Антрацен	3	76,5±3,8	42,4±3,8
Флуорантен	4	82,4±3,8	62,1±3,8

Примечание: М - среднее четырех повторностей; В - дисперсионный интервал с вероятностью 95%.

Пример 8. В эксикаторы объемом 3 дм<sup>3</sup> с 2 кг дерново-подзолистой почвы вносят 1% по массе нефти, мазута, дизельного топлива и тщательно перемешивают.

Суспензию бактерий штамма Pseudomonas alcaligenes MEV разводят фосфатным буферным раствором pH 7,2 и вносят в почву, загрязненную ксенобиотиками из расчета 1·10<sup>7</sup> КОЕ на 1 г почвы. Почву тщательно перемешивают, увлажняют до 60% от общей влагоемкости и экспонируют при 20 °С в течение 2 месяцев. Для анализа образцы почвы отбирают в момент начала эксперимента и через 2 месяца. Эффективность биодegradации нефти и продуктов ее переработки предлагаемым штаммом в почве оценивают методом газожидкостной хроматографии. Результаты исследований показывают, что предлагаемый штамм в течение 2 месяцев при температуре 20°С осуществляет деградацию 74% нефти, 63% мазута и 100% дизельного топлива.

Таблица 7  
Биодegradация нефти и продуктов ее переработки в почве при температуре 20°С  
штаммом Pseudomonas alcaligenes MEV в течение 2 месяцев, % (MCM)

Вещества	Биодegradация
Нефть	74,0±3,8
Мазут М-40	63,0±3,8
Дизельное топливо	82,3±3,8

Примечание: М - среднее четырех повторностей; В - дисперсионный интервал с вероятностью 95%.

Пример 9. Предлагаемый штамм вносят в почву так же как в примере 8. Однако эксперимент проводят при 30°С. Результаты представлены в таблице 8.

Таблица 8  
Биодegradация нефти в присутствии ее переработки в почве при температуре 30°С  
штаммом Pseudomonas alcaligenes MEV в течение 2 месяцев, % (MCM)

Вещества	Биодegradация
Нефть	72,0±3,8
Мазут М-40	53,4±3,8
Дизельное топливо	97,3±3,8

Примечание: М - среднее четырех повторностей; В - дисперсионный интервал с вероятностью 95%.

Пример 10. В эксикаторы объемом 3 дм<sup>3</sup> с 2 кг дерново-подзолистой почвы вносят 1% по массе смеси нафталина (4 г), фенантрена (4 г), антрацена (4 г), флуорантена (4 г), фенола (4 г) и тщательно перемешивают. Суспензию бактерий штамма Pseudomonas alcaligenes MEV полученную как в примере 1 разводят фосфатным буферным раствором с pH 7,2 до титра 1·10<sup>8</sup> КОЕ/см<sup>3</sup> и вносят в почву, загрязненную ксенобиотиками из расчета 1·10<sup>7</sup> КОЕ на 1 г почвы. Почву тщательно перемешивают, увлажняют до 60% от общей влагоемкости и экспонируют при 20 °С в течение 2 месяцев. Для анализа образцы почвы отбирают в начале эксперимента и через 2 месяца. Эффективность биодegradации нефти и продуктов ее переработки предлагаемым штаммом в почве оценивают методом

газожидкостной хроматографии. Результаты исследований показывают, что предлагаемый штамм в течение 2 месяцев при температуре 20°С осуществляет деградацию 100% нафталина и фенантрена, 86% флуорантена, 46% антрацена и 63% фенола.

Таблица 9  
Биодegradация полициклических ароматических углеводородов в феноле в почве  
штаммом Pseudomonas alcaligenes MEV при 20°С, % (MCM)

Вещества	Число экспериментов в повторности	Биодegradация
Нафталин	2	100
Фенантрен	3	100
Антрацен	3	42,4±3,8
Флуорантен	4	62,1±3,8
Фенол	1	46,3±3,8

Примечание: М - среднее четырех повторностей; В - дисперсионный интервал с вероятностью 95%.

Пример 11. В эксикаторы объемом 3 дм<sup>3</sup> с 2 кг дерново-подзолистой почвы вносят 20 г нефти и 15 мг/кг почвы солей Pb, Zn, Mo, Fe, и Cr - 50 мг/кг и клетки штамма Pseudomonas alcaligenes MEV до концентрации 1·10<sup>7</sup> КОЕ/г почвы. Почву тщательно перемешивают, увлажняют до 60% от общей влагоемкости и экспонируют при 20 °С в течение 2 месяцев. Для анализа образцы почвы отбирают в начале эксперимента и через 2 месяца. Эффективность биодegradации нефти предлагаемым штаммом в почве оценивают методом газожидкостной хроматографии. Контролем служит почва с нефтью и внесенными микроорганизмами. Повторность опыта четырехкратная. Результаты эксперимента показывают, что эффективность деградации нефти предлагаемым штаммом в вариантах с солями металлов и без них не отличается (таблица 10).

Таблица 10  
Биодegradация нефти в почве в присутствии тяжелых металлов штаммом  
Pseudomonas alcaligenes MEV, % (MCM)

Вещества	С солями металлов	Без солей металлов
Нефть	72,0±3,8	72,0±3,8

Примечание: М - среднее четырех повторностей; В - дисперсионный интервал с вероятностью 95%.

Таким образом, преимуществом предлагаемого штамма является то, что он утилизирует при температуре 20 - 30°С нефть, мазут и дизельное топливо в почве и воде от 43,4% до 97,3%, а также полициклические ароматические углеводороды, содержащие от 2 до 4 бензольных колец (нафталин, фенантрен, антрацен, флуорантен). Предлагаемый штамм продуцирует биологические поверхностно-активные вещества, что ускоряет деградацию полициклических ароматических углеводородов в водной среде. Устойчивость штамма к ионам тяжелых металлов расширяет диапазон его применения при очистке территорий от комбинированного загрязнения углеводородами нефти и металлами.

#### Список литературы

1. Патент России №2134723, кл. С 12 N 1/20. Штамм Pseudomonas alcaligenes E7, используемый для очистки воды и почвы от нефти и нефтепродуктов. - 1999.
2. Патент России №2157842, кл. С 12 N 1/26. Штамм Trichoderma lignorum Л-1 ГКМ ВИЗР №103 для окисления углеводородов нефти и нефтепродуктов. - 2000.
3. Патент России №2133770, кл. С 12 N

1/20. Штамм *Pseudomonas alcaligenes* B-1, используемый для очистки воды и почвы от нефти и нефтепродуктов. - 1999.

4. Патент России №92005971, кл. С 12 N 1/20. Штамм *Mycobacterium flavescens* EX-91, используемый для очистки воды и почвы от нефти и нефтепродуктов. - 1996.

5. Патент России №95119734, кл. С 12 N 1/20. Штамм *Rhodococcus species* 56D, используемый для очистки воды и почвы от нефти и нефтепродуктов. - 1998.

6. Патент России №2134722, кл. С 12 N 1/20. Штамм *Pseudomonas putida* 9, используемый для очистки воды и почвы от нефти и нефтепродуктов. - 1999.

7. Патент России №2133769, кл. С 12 N

1/20. Штамм *Rhodococcus species* MFN, используемый для очистки воды и почвы от нефти и нефтепродуктов. - 1998.

8. Дэвис Р., Бодстайн Д., Рот Дж. Методы генетической инженерии. Генетика бактерий. Пер. с англ. под редакцией чл. - корр. АН СССР Р.Б.Хесина. - М: Мир, 1984-176 с.

9. Bergey's Manual of Determinative Bacteriology. Ninth Edition. Baltimore, Maryland: Williams & Wilkins, 1994. - 767 p.

# Формула изобретения:

Сурфактантообразующий штамм бактерий *Pseudomonas alcaligenes* MEV депонирован в ВКПМ В-8278, используемый для очистки почв, грунтовых и поверхностных вод от нефти и продуктов ее переработки in situ.

RU 2228953 C2

RU 2228953 C2